

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 502**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.04.2007** **PCT/NL2007/050175**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.11.2007** **WO07123402**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2007** **E 07747399 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017** **EP 2012813**

54 Título: **Intervención terapéutica en una enfermedad genética en un individuo mediante la modificación de la expresión de un gen expresado de forma aberrante o anormal**

30 Prioridad:

20.04.2006 WO PCT/NL2006/000207

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

05.03.2018

73 Titular/es:

**ACADEMISCH ZIEKENHUIS LEIDEN (100.0%)
ALBINUSDREEF 2
2333 ZA LEIDEN, NL**

72 Inventor/es:

**'T HOEN, PETER ABRAHAM CHRISTIAAN;
STERRENBURG, PETRONELLA JOHANNA
ELISABETH;
DEN DUNNEN, JOHANNES THEODORUS y
VAN OMMEN, GARRIT-JAN BOUDEWIJN**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 657 502 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Intervención terapéutica en una enfermedad genética en un individuo mediante la modificación de la expresión de un gen expresado de forma aberrante o anormal

5

[0001] La invención se refiere al ámbito de las enfermedades genéticas. En concreto, la invención se refiere a la mejora de una terapia para una enfermedad genética mediante la corrección de un efecto secundario de una enfermedad genética en un individuo.

10

[0002] Una enfermedad genética es una enfermedad provocada por anomalías en el material genético de un individuo. La expresión de una enfermedad en un individuo no solo depende de factores genéticos, sino que los factores medioambientales también desempeñan un papel. Una posible clasificación para los trastornos genéticos es una división en dos tipos diferentes, monogénicos o poligénicos. Un trastorno genético monogénico es provocado por una mutación que ocurre en la secuencia de ADN de un gen. Existen más de 6000 trastornos monogénicos conocidos (información del Proyecto Genoma Humano). Algunos ejemplos son la fibrosis quística, la anemia de células falciformes, el síndrome de Marfan, la enfermedad de Huntington y la hemocromatosis hereditaria. Las enfermedades monogénicas son hereditarias en patrones reconocibles: dominante autosómico, recesivo autosómico y ligado al cromosoma X. Una enfermedad genética poligénica es causada por mutaciones en múltiples genes. Dos categorías que se pueden distinguir dentro del grupo de los trastornos genéticos son los trastornos cromosómicos y mitocondriales.

15

20

[0003] Una enfermedad genética cromosómica es causada por anomalías en la estructura del cromosoma. Las anomalías en la estructura del cromosoma tales como copias que faltan o extra o rupturas y reconexiones (translocaciones) en general pueden resultar en la enfermedad. Algunos tipos de anomalías cromosómicas importantes se pueden detectar por examen microscópico. El síndrome de Down o la trisomía 21 es un trastorno común que ocurre cuando una persona tiene tres copias del cromosoma 21.

25

[0004] Una enfermedad genética mitocondrial es un tipo de enfermedad genética relativamente raro. Este tipo de trastorno es causado por mutaciones en el ADN no cromosómico de las mitocondrias. Cada mitocondria puede contener de 5 a 10 fragmentos circulares de ADN. Una enfermedad genética cromosómica así como mitocondrial puede ser o una enfermedad monogénica o una enfermedad poligénica.

30

[0005] La identificación de un gen en el que se ha producido una mutación ofrece una oportunidad de desarrollar una terapia específica. La investigación en la identificación de genes, implicados en diversas enfermedades genéticas, ha sido intensa en la década pasada. El Proyecto Genoma Humano, que ha identificado prácticamente todos los genes del ADN humano, tuvo un papel importante en el progreso de este tipo de investigación. Muchas de las enfermedades genéticas son causadas por un defecto en un gen crucial. Frecuentemente, el defecto resulta en una cantidad reducida o inexistente de la función de un producto del gen afectado. Las terapias que utilizan el conocimiento molecular de las razones subyacentes a este tipo de defectos genéticos típicamente pretenden proporcionar a las células afectadas un producto génico (parcialmente) funcional.

35

40

[0006] Dahlqvist et al. (Development, 2003,130(24) p.6089) trata de la inhibición de la BMP4 bajo el control de la ruta Notch.

45

[0007] KR20030035047 (Chae Chang Hyn & Kim Seong Gon, 9 de mayo de 2003) y EP1380644A tratan del uso médico de oligonucleótidos antisentido de BMP4.

50

[0008] En la presente invención se ha descubierto que otros genes distintos de los afectados se pueden desregular en células de dicho individuo, y que dicha desregulación puede contribuir a la gravedad y/o los síntomas de la enfermedad. Sorprendentemente, esta desregulación (expresión aberrante) se encontró incluso cuando el gen afectado por la mutación subyacente al defecto genético no es directamente responsable de la expresión del gen expresado de forma aberrante o cuando la expresión aberrante del gen no está relacionada directamente con la función de la proteína que se ve afectada por el defecto genético. Un objeto de la presente invención es, por lo tanto, corregir al menos uno de los efectos secundarios que potencialmente agravan la enfermedad de dicho defecto genético de dicho paciente mediante la modulación de la expresión de dicho gen expresado de forma aberrante. Así, parece que, además de un gen mutado que se puede identificar como un factor causal para una enfermedad genética, hay otros genes que son expresados de manera aberrante, aunque esos genes parecen no ser directamente influidos por dicho gen mutado o su homólogo normal. La presente invención identifica varios de dichos genes expresados de forma aberrante. La presente observación se hizo en enfermedades genéticas que son causadas por un defecto en células diferenciadas. Se ha descubierto que los genes se pueden desregular ya en el precursor de dicha célula diferenciada aún cuando el gen afectado por la mutación (la causa del defecto genético) no está expresado de manera normal en dicha célula precursora. En otras palabras, dicho gen expresado de forma aberrante está presente en otras células distintas de las células diferenciadas que expresan el fenotipo de dicha enfermedad genética. La invención ofrece nuevas revelaciones para el tratamiento de las enfermedades genéticas, en particular para enfermedades genéticas provocadas por la

55

60

65

falta (parcial) de función o la ausencia de un producto génico en células diferenciadas de dicho individuo. En la presente invención, la expresión de dicho gen expresado de forma aberrante se modifica, o bien en cultivos de células precursoras de dichas células diferenciadas o bien directamente en un paciente. Cuando se aplica en cultivos de dichas células precursoras, mejora la capacidad de dichas células precursoras para formar nuevas células diferenciadas después del trasplante de dichas células precursoras a un paciente, mejorando así el éxito de dicha terapia de trasplante celular. Cuando se aplica directamente en el paciente, la invención proporciona un método para paliar un síntoma agravante de una enfermedad genética en un individuo, donde dicho síntoma es preferiblemente la capacidad reducida de dichas células precursoras para diferenciarse en dichas células diferenciadas, donde dicha enfermedad es el resultado de un gen con disfunción en una célula diferenciada de dicho individuo, donde dicho método comprende modificar la expresión de al menos un gen expresado de forma aberrante en dicha célula precursora, donde dicho gen expresado de forma aberrante no es dicho gen con disfunción. El gen con disfunción y los efectos directos causados por su defecto se denominan típicamente efecto primario, mientras que los efectos indirectos que ocurren posteriormente como resultado de la disfunción de la célula que comprende dicho defecto genético se denominan frecuentemente efectos secundarios. Estos efectos secundarios típicamente no son un resultado directo de la disfunción del gen.

[0009] La invención también proporciona el uso de un compuesto para modificar la expresión de al menos un gen, para la producción de un medicamento para el alivio de un síntoma de una enfermedad genética en un individuo, donde dicha enfermedad es el resultado de un defecto genético en una célula diferenciada de dicho individuo, donde dicho gen es expresado de forma aberrante en un precursor de dicha célula diferenciada y donde dicha expresión aberrante no está directamente relacionada con la mutación subyacente a dicho defecto genético (el gen con la disfunción).

[0010] El defecto genético afecta típicamente al menos a parte de la función de un gen o su producto. Esto puede ser provocado por una gran variedad de mutaciones. Por ejemplo, una mutación puede estar en la región codificante del gen, dando así como resultado la producción de una proteína/un ARN defectuoso/a. Por otro lado, la mutación también puede estar en una o más de la secuencia reguladora que controla la expresión del producto génico. Tal mutación también puede suponer una pérdida (parcial) de función de un producto génico de dicho gen, ya que el nivel de producto génico en la célula, o la cadencia de la expresión en la célula, cambia. El tipo de mutación también puede variar. La mutación puede ser por ejemplo una delección, una inserción, una inversión o una mutación puntual. También hay mutaciones que se denominan mutaciones silenciosas, es decir, que no afectan significativamente a la salud de un individuo. Algunos ejemplos de tales mutaciones son mutaciones puntuales en codones que, debido a la redundancia en el potencial de codificación, no cambian el aminoácido que se incorpora a la proteína. Será evidente que las mutaciones silenciosas no están dentro del alcance de la presente invención. Un gen mutado, como causa de una enfermedad genética, según se usa en la invención es un gen con una mutación no silenciosa.

[0011] Las células del cuerpo típicamente tienen una duración de vida limitada. Muchas de estas células se reponen mediante las denominadas células precursoras. Por ejemplo, las células muertas de la piel se reponen continuamente a partir de células precursoras (troncales). Las células del revestimiento intestinal son repuestas de forma similar por células denominadas troncales. Las células musculares se (re)generan típicamente por fusión con células precursoras llamadas mioblastos; los glóbulos rojos son repuestos por células precursoras que en última instancia se originan en la médula ósea de un individuo. La regeneración solo puede ocurrir cuando la célula precursora deja su estado primitivo en un proceso denominado diferenciación. Las propias células precursoras también pueden tener una duración de vida y/o actividad limitada y, en ese, caso son reemplazadas por otras células precursoras con una duración de vida y/o un potencial regenerativo más extensos. La célula final con una duración de vida limitada y un potencial de autorrenovación limitado se denomina una célula diferenciada, mientras que la precursora que a menudo tiene un potencial mayor de autorrenovación se denomina una célula no diferenciada. Esto último generalmente se debe al hecho de que las células diferenciadas muestran funciones que no muestra la precursora. En una forma de realización preferida, dicha célula precursora es un mioblasto y/o un precursor de este. En una forma de realización preferida, dicha célula diferenciada es una célula muscular. Un individuo con una enfermedad genética puede mostrar muchos síntomas. Cuando se hace referencia al alivio del síntoma de una enfermedad, se hace referencia a que la gravedad de un síntoma se ve al menos reducida. En caso de atrofia muscular, por ejemplo, los síntomas de la enfermedad abarcan, entre otros, la reducción de fuerza muscular con la edad, la reducción de la masa muscular con la edad, una duración de la vida limitada y la reducción de la calidad de vida con la edad (por ejemplo, la incapacidad de caminar, la dependencia de cuidados y de la medicación). En el ejemplo de la atrofia muscular, el alivio de un síntoma puede ser la mejora de la fuerza muscular, de la duración de la vida y/o la mejora de la calidad de vida en general, en comparación con un individuo no tratado que tiene el mismo pronóstico que tendría el individuo tratado en ausencia de tratamiento.

[0012] Un gen que está expresado de forma aberrante en un individuo que padece dicha enfermedad genética puede estar expresado a un nivel demasiado alto o demasiado bajo en comparación con el mismo gen que está expresado fisiológicamente en un individuo sano. La modificación de la expresión en un método o uso según la invención comprende el aumento de la expresión de dicho gen expresado de forma aberrante cuando su expresión es inferior a la de dicho gen en un estado normal o, según la invención, comprende reducir la

expresión de dicho gen expresado de forma aberrante cuando su expresión es superior a la de dicho gen en dicho estado normal. El aumento de la expresión cuando es demasiado baja o la reducción de la expresión cuando es demasiado alta corrige cambios secundarios al defecto genético primario y alivia un síntoma de una enfermedad genética. Al hacerlo, la expresión de dicho gen expresado de forma aberrante se lleva a niveles más aceptables fisiológicamente. En una forma de realización preferida de la invención, la expresión de dicho gen expresado de forma aberrante se normaliza básicamente. Los niveles fisiológicamente aceptables serán a menudo niveles que son niveles aproximadamente normales. Los niveles normales son niveles que pueden encontrarse en un individuo sano de la misma edad y constitución. Los niveles fisiológicamente aceptables pueden estar fuera de un rango normal pero siguen proporcionando una función suficiente para un individuo. En una forma de realización preferida, la invención proporciona un uso según la invención, donde la modificación de dicha expresión comprende niveles aproximativos al estado normal. Se describe un método para el mismo.

[0013] La modificación de la expresión se puede conseguir de varias maneras. La reducción de la expresión de un gen expresado de forma aberrante se puede llevar a cabo, por ejemplo, aplicando terapia antisentido o mediante la administración de una proteína supresora que se une al promotor de dicho gen expresado de forma aberrante. El aumento de la expresión de un gen expresado de forma aberrante se lleva a cabo, por ejemplo, mediante la adición de un transgén que expresa dicho gen expresado de forma aberrante, mediante la adición y/o activación de un factor de transcripción que estimula la expresión de dicho gen expresado de forma aberrante y/o mediante la activación del promotor y/o secuencia potenciadora de dicho gen expresado de forma aberrante. En una forma de realización preferida de la invención, la expresión se modifica proporcionando a dicho individuo una secuencia antisentido de dicho gen expresado de forma aberrante. Actualmente existen muchos métodos antisentido diferentes para reducir la producción de un producto génico. La tecnología antisentido aprovecha análogos de oligonucleótidos para la unión a ARN objetivo mediante hibridación de Watson-Crick. Una vez unido, el agente antisentido o bien deshabilita o bien induce la degradación del ARN objetivo. Los agentes antisentido también pueden alterar el empalme. Durante la década pasada se ha aprendido mucho acerca de los mecanismos básicos antisentido, la química medicinal, y las propiedades farmacológicas, farmacocinéticas y toxicológicas de las moléculas antisentido. La tecnología antisentido ha demostrado ser valiosa para la funcionalización de gen y la validación de puntos de actuación o dianas. Con un fármaco comercializado, Vitravene, y aproximadamente 20 fármacos antisentido en desarrollo clínico, los fármacos antisentido son fármacos importantes en el tratamiento de una amplia gama de enfermedades (para reseñas véase [1]). Los ejemplos no limitativos de algunos de los nuevos métodos antisentido son ARN interferente (ARNi), micro-ARN y técnicas de interferencia de empalme tales como el salto de exón. Una secuencia antisentido se administra preferiblemente como una molécula monocatenaria o como parte de una molécula en horquilla. Una secuencia antisentido se puede administrar directamente o producirse en una célula mediante un casete de expresión (transducido por virus).

[0014] Un oligonucleótido antisentido se proporciona a una célula preferiblemente como parte de un vehículo de inserción de genes. Tal vehículo es preferiblemente un liposoma o un vehículo de inserción de genes viral. Los liposomas son ampliamente conocidos en la técnica y muchas variantes están disponibles para fines de transferencia genética. Actualmente se usan varios vehículos de inserción de genes para transferir genes a células específicas. En la presente invención se prefiere usar los vectores virales que no expresan sus propios genes, sino solo los genes transferidos. La molécula antisentido puede estar presente como tal en el vehículo de inserción de genes. En un vector viral, la molécula antisentido preferiblemente está provista como un casete de expresión, donde el casete de expresión codifica un transcrito que comprende dicho oligonucleótido antisentido. Un vehículo de inserción viral preferido es un vector adenoviral y más preferiblemente un vector viral adeno-asociado. La invención, por lo tanto, también proporciona tales casetes de expresión, vectores y vehículos de inserción de genes. Depende del conocimiento del experto el diseñar transcritos adecuados. Para la invención se prefieren transcritos realizados por la Pol III. Preferiblemente en forma de un transcrito de fusión con un transcrito U1 o U7. Tales fusiones se pueden generar como se describe en las referencias [2-4]. En la presente invención, un oligonucleótido es un polímero de ADN o nucleótidos de ARN (típicamente entre 5 y 300 nucleótidos). Los oligonucleótidos se pueden sintetizar in vitro o in vivo. En el último contexto, a veces también se refieren a una molécula/secuencia antisentido, ARNip, miARN y similares. En una forma de realización preferida, un oligonucleótido comprende entre 5-300 nucleótidos, más preferiblemente entre 15 y 25 nucleótidos. La secuencia antisentido se puede insertar in vivo o ex vivo, es decir, en células precursoras que posteriormente se usan para terapias de trasplante celular. Así, en una forma de realización preferida, dicho compuesto comprende una molécula antisentido o un equivalente funcional de la misma. Un equivalente funcional de una molécula antisentido de la invención tiene el mismo efecto inhibidor de expresión en cuanto al tipo, no necesariamente a la cantidad, que dicha molécula antisentido. La molécula antisentido o el equivalente funcional de la misma se puede diseñar de varias maneras. Se hace referencia a [1] y sus referencias para más detalles acerca del diseño de las moléculas antisentido. La reducción o la regulación por disminución de la expresión un gen expresado de forma aberrante típicamente resulta en niveles disminuidos de producto génico codificado por dicho gen en dicha célula. Dicho producto génico es preferiblemente ARN producido por dicho gen, por ejemplo un micro-ARN. En otra forma de realización preferida de la invención, dicho compuesto comprende una proteína capaz de inhibir la función de dicho gen expresado de forma aberrante. En una forma de realización preferida de la invención, dicho compuesto comprende nogina o una parte funcional, derivada y/o análoga de la misma. La nogina es capaz de inhibir la función de la BMP-4 [5].

[0015] Se describen muchas maneras de aumentar la expresión de un gen (expresado de forma aberrante) en una célula. Ejemplos no limitativos son la introducción de una construcción de expresión que comprende una secuencia codificante para dicho gen, la expresión de un factor de transcripción que activa o estimula la expresión del gen endógenamente presente y la expresión de análogos, derivados y/o partes de dicho gen en dicha célula. También es posible transfectar directamente proteína o ARN codificado/a por dicho gen en dicha célula. A estos métodos se hace referencia colectivamente como terapia génica en este documento. En una forma de realización, la invención, por lo tanto, proporciona un uso o un método, donde la modificación de dicha expresión comprende terapia génica. Dicha terapia génica se puede llevar a cabo en un método ex vivo o en un método in vivo. El aumento de la expresión de un producto génico en una célula produce preferiblemente niveles aumentados de producto génico en dicha célula. El nivel inicial puede no ser detectable.

[0016] Un trastorno muscular es una enfermedad que normalmente tiene un impacto significativo en la vida de un individuo. Cualquier medida que se pueda tomar para paliar las consecuencias de un trastorno muscular podría significar, por lo tanto, un alivio para un individuo con dicho trastorno muscular. Como las células musculares diferenciadas se reponen y/o se regeneran a través de las células precursoras mioblastos, la presente invención es particularmente adecuada para el tratamiento de trastornos musculares. La invención proporciona un uso según la invención, donde al menos una parte de los síntomas mostrados por dicho individuo que padece dicha enfermedad genética se debe a una diferenciación anormal de las células precursoras musculares además de la disfunción de células musculares diferenciadas en dicho individuo en comparación con un individuo sano. Se describe un método para el mismo. Un trastorno muscular puede tener o bien una causa genética o bien una causa no genética. Un ejemplo preferido de una enfermedad de causa genética es una distrofia muscular genética.

[0017] Las distrofias musculares genéticas constituyen un grupo de trastornos genéticos caracterizados por atrofia muscular progresiva y debilidad. Muchos de estos trastornos son causados por defectos en genes para las proteínas musculares. Las diferentes formas de distrofias musculares genéticas difieren con frecuencia en la(s) proteína(s) implicada(s). La mayor parte de los genes afectados en estos trastornos codifican proteínas que parecen desempeñar un papel de soporte de la estructura de las fibras musculares, alternativamente algunas proteínas pueden estar relacionadas con procesos bioquímicos que ocurren en las fibras musculares. La invención proporciona un uso según la invención, donde dicha enfermedad genética comprende una distrofia muscular genética. Se describe un método para el mismo. Las distrofias musculares generalmente son hereditarias, aunque hay casos en los que no existe ningún historial familiar de la enfermedad. El cuadro clínico de las diferentes formas de distrofias musculares genéticas varía entre otras cosas en los músculos que se ven afectados primero y con mayor frecuencia, el índice en el que los síntomas progresan y la edad de aparición.

[0018] Hay múltiples métodos de diagnóstico disponibles para el diagnóstico de las distrofias musculares genéticas y la diferenciación entre éstas. La mayoría de las veces se utiliza una combinación de varios métodos para hacer un diagnóstico. Un diagnóstico normalmente comienza con una evaluación del historial médico de un paciente y un examen físico. Los ejemplos de pruebas diagnósticas disponibles son un análisis de sangre para medir las enzimas (por ejemplo para creatina quinasa, CK), evaluación de la histología del músculo, prueba de ADN, resonancia magnética (RM), electromiograma (EMG) y estudio de la velocidad de conducción nerviosa (VCN). La invención divulga un uso según la invención, donde dicha distrofia muscular genética es una de las siguientes enfermedades: distrofia muscular de Becker (DMB) o distrofia muscular de Duchenne (DMD). Se describe método para el mismo. La invención también divulga un uso o un método en el que dicha distrofia muscular genética es una de las siguientes enfermedades: distrofia muscular congénita (DMC), distrofia muscular distal (DD), distrofia muscular de Emery-Dreifuss (DMED), distrofia muscular facioescapulohumeral (DFEH), distrofia muscular de cinturas (LGMD), distrofia miotónica (DM), distrofia muscular oculofaríngea (DMOF). A continuación se da una breve descripción de la causa de las distrofias musculares genéticas anteriormente mencionadas.

Distrofia muscular de Becker (DMB), producción insuficiente de distrofina funcional, una proteína que ayuda a mantener intactas las células musculares.

Distrofia muscular congénita (DMC), mutaciones genéticas que afectan a algunas de las proteínas necesarias para los músculos y a veces para los ojos y/o el cerebro.

Distrofia muscular Distal (DD), una mutación en cualquiera de al menos siete genes que afectan a las proteínas necesarias para la función de los músculos.

Distrofia muscular de Duchenne, (DMD) ausencia de distrofina, una proteína que ayuda a mantener intactas las células musculares.

Distrofia muscular de Emery-Dreifuss (DMED), mutaciones en los genes que producen proteínas emerina, lamina A o lamina C, en la membrana que rodea el núcleo de cada célula muscular.

Distrofia muscular facioescapulohumeral (DFEH), un fragmento de ADN que falta en el cromosoma 4.

Distrofia muscular de cinturas (LGMD), una mutación en cualquiera de al menos 15 genes diferentes que afectan a las proteínas necesarias para la función muscular.

Distrofia miotónica (DM), una sección de ADN repetida en el cromosoma 19 o en el cromosoma 3.

Distrofia Muscular oculofaríngea (DMOF), un gen defectuoso para la proteína de unión a poli-(A) 1 (PABPN1), que se sospecha es la causante de la agregación de ARN y proteínas en los núcleos de las células musculares.

[0019] Tanto en la distrofia muscular de Duchenne como en la de Becker, la proteína muscular distrofina se ve afectada. En la distrofia de Duchenne la distrofina está ausente, mientras que en la de Becker está presente algo de distrofina pero su producción normalmente no es suficiente y/o la distrofina que está presente está formada de manera anormal. Ambas enfermedades se asocian a una herencia recesiva ligada al cromosoma X. La DMD resulta de una mutación de desplazamiento del marco de lectura en el gen DMD [6;7]. El desplazamiento del marco de lectura en el gen DMD resulta en la producción de una proteína distrofina no funcional truncada [8]. La DMB ocurre como consecuencia de múltiples mutaciones en el gen DMD. Como en la distrofia de Becker está presente algo de distrofina, a diferencia de la de Duchenne, donde la distrofina está ausente, la de Becker tiene síntomas menos graves que la de Duchenne. La aparición de la DMD es anterior que la DMB. La DMD normalmente se manifiesta en la infancia temprana, y la DMB en los adolescentes o en la edad adulta temprana. La progresión de la distrofia de Becker es más lenta y menos previsible que la de Duchenne. Los pacientes con DMB pueden sobrevivir hasta la etapa media o avanzada de la edad adulta. Los pacientes con Duchenne raramente sobreviven más allá de la treintena.

[0020] La distrofina desempeña un papel estructural importante en la fibra muscular, que conecta la matriz extracelular y el citoesqueleto. La región N-terminal se une a actina, mientras que el extremo C-terminal forma parte del complejo distrofina-glicoproteína (DGC), que abarca el sarcolema [9]. En ausencia de distrofina, el estrés mecánico lleva a rupturas del sarcolema, lo que causa un flujo descontrolado de calcio hacia el interior de la fibra muscular, lo que activa proteasas activadas por calcio y la necrosis de las fibras [10].

[0021] Un precursor de una célula diferenciada tiene características específicas que hacen que se diferencie en una célula con funciones específicas. Estas características específicas comprenden la presencia y el estado de activación de una categoría de genes que están implicados en el control de la diferenciación de una célula. En la presente invención se ha descubierto que los genes particularmente controladores contribuyen a los síntomas del defecto genético cuando se expresan de forma aberrante en la célula precursora. La invención, por lo tanto, proporciona un uso según la invención, donde dicho gen expresado de forma aberrante es un factor de control en la diferenciación de dicha célula precursora en dicha célula diferenciada. Se describe un método para el mismo. Un factor de control es un factor que controla solo, o con otros factores de control, al menos un paso en la diferenciación de una célula precursora en una célula diferenciada. El control de dicho al menos un paso en la diferenciación puede ser estimulador o inhibitorio. Dicho factor de control realiza este control al formar parte de una cascada de transducción de señal. Dicho factor de control se localiza preferiblemente al principio de dicha cascada de transducción de señal, recibiendo señales que vienen, por ejemplo, de fuera de la célula donde se localiza dicha cascada. En otra forma de realización preferida de la invención, dicho factor de control se localiza al final de dicha cascada de transducción de señal, efectuando señales que son transducidas por dicha cascada. Un factor de control es un factor de crecimiento. Se describe un factor de control que es un factor de transcripción.

[0022] Un factor de crecimiento es una proteína pequeña que se une a receptores específicos en la superficie de las células y promueve la proliferación, el crecimiento, la diferenciación y/o la maduración de estas células. Ejemplos de factores de crecimiento son: factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF); factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF); factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); eritropoyetina (EPO); trombopoyetina (TPO); miostatina (GDF-8) y/o factor 2 de crecimiento de fibroblastos (FGF-2). En una forma de realización preferida, la invención proporciona un uso o un método según la invención, donde dicho factor de control comprende un factor de crecimiento o una parte funcional, derivada y/o análoga del mismo, preferiblemente factor de crecimiento de fibroblastos (FGF2) o proteínas de unión a los factores de crecimiento similares a la insulina (IGFBP3), o una parte funcional, derivada y/o análoga de los mismos. En una forma de realización preferida, la invención proporciona un uso según la invención, donde dicho factor de control comprende BMP4 o una parte funcional, derivada y/o análoga de la misma. Se describe un método para el mismo. El factor 2 de crecimiento de fibroblastos (FGF2) es un factor de crecimiento de polipéptidos monocatenarios que desempeña un papel significativo en el proceso de cicatrización de una herida y es un inductor potente de angiogénesis. Existen varias formas de la proteína humana que varían de 18-24 kDa de tamaño debido al uso de sitios de inicio alternativos en el gen fgf-2. Tiene un 55 por ciento de identidad de residuos de aminoácidos con respecto al factor 1 de crecimiento de fibroblastos y tiene una potente actividad de unión a heparina. El factor de crecimiento es un inductor extremadamente potente de la síntesis de ADN en una variedad de tipos de célula de linajes mesodérmicos y neuroectodérmicos.

[0023] El factor de crecimiento insulínico tipo II es un factor estimulante de la multiplicación. Se trata de un péptido neutral bien caracterizado que se cree que es segregado por el hígado y circula en la sangre. Tiene actividades reguladoras del crecimiento, similares a la insulina y mitogénicas. La proteína de unión a los factores de crecimiento similares a la insulina 3 (IGFBP3) es una de las seis proteínas solubles homólogas que se unen a factores de crecimiento similares a la insulina (somatomedinas) y modulan sus acciones mitogénicas y metabólicas a nivel celular.

[0024] El factor de crecimiento transformante (TGF) es uno de muchos factores de crecimiento caracterizados que existen en la naturaleza. Los factores de crecimiento transformantes son polipéptidos hormonalmente

activos que pueden inducir el fenotipo transformado cuando se añaden a células normales no transformadas. Sus actividades de transformación se deben a la acción simultánea de dos factores que de otro modo no están relacionados, el factor de crecimiento transformante alfa y el factor de crecimiento transformante beta. En una forma de realización preferida, la invención proporciona un uso según la invención, donde dicho factor de crecimiento pertenece a la superfamilia del factor de crecimiento transformante β (TGF β) o es una parte funcional, derivada y/o análoga del mismo. Se describe un método para el mismo. El TGF β es un factor sintetizado en una amplia variedad de tejidos. Actúa sinérgicamente con el TGF-alfa para inducir la transformación fenotípica y también puede actuar como factor de crecimiento autocrino negativo. El TGF-beta tiene un papel en el desarrollo embrional, la diferenciación celular, la secreción de hormonas y la función inmunológica. El TGF-beta se encuentra principalmente como formas homodiméricas de productos genéticos separados TGF-beta1, TGF-beta2 o TGF-beta3. Se han aislado heterodímeros compuestos por TGF-beta1 y 2 (TGF-beta1.2) o TGF-beta2 y 3 (TGF-beta2.3). Las proteínas TGF-beta se sintetizan como proteínas precursoras. El factor de crecimiento transformante alfa es un factor que se ha aislado en una variedad de tejidos, incluyendo el epitelio y la decidua materna. Está estrechamente relacionado con el factor de crecimiento epidérmico y se une al receptor de EGF. El TGF-alfa actúa sinérgicamente con el TGF-beta para inducir la transformación fenotípica, pero su papel fisiológico se desconoce.

[0025] La miostatina (también conocida como factor 8 de crecimiento y diferenciación) es un factor de crecimiento que limita el crecimiento del tejido muscular, esto es, concentraciones más altas de miostatina en el cuerpo causan que el individuo tenga músculos menos desarrollados. La proteína miostatina se produce en las células musculares, circula en la sangre y actúa en el tejido muscular, aparentemente ralentizando el desarrollo de las células musculares (troncales) [11]. La miostatina es un miembro de la superfamilia de proteínas TGF-beta. En una forma de realización preferida, la invención proporciona un uso y un método según la invención, donde dicho factor de control comprende miostatina.

[0026] Las proteínas morfogenéticas óseas (BMP) son factores reguladores que son miembros de la superfamilia de proteínas del factor de crecimiento transformante beta. Se sintetizan como moléculas precursoras grandes que son degradadas por enzimas proteolíticas. La forma activa puede consistir en un dímero de dos proteínas idénticas o un heterodímero de dos relativas proteínas morfogenéticas óseas. Las proteínas morfogenéticas óseas están implicadas en una gran variedad de procesos celulares [12]. Las BMP están implicadas en la diferenciación de determinados tipos de células, incluyendo las células miogénicas. En una forma de realización preferida, la invención proporciona un uso según la invención, donde dicho factor de crecimiento transformante beta es BMP4 o una parte funcional, derivada y/o análoga del mismo. Se describe un método para el mismo. También se describe un uso o un método según la invención, donde dicho factor de crecimiento transformante beta es una proteína morfogenética ósea (BMP) o una parte funcional, derivada y/o análoga del mismo.

[0027] Los mecanismos que regulan la diferenciación celular también implican factores de transcripción. En una forma de realización, la invención proporciona un uso o un método según la invención, donde dicho factor de control comprende un factor de transcripción. Un factor de transcripción es una proteína necesaria para iniciar la transcripción de un gen. Los factores de transcripción pueden ser específicos de un tejido, lo que significa que esos factores solo tienen una función en la transcripción de uno o unos pocos gen(es) específico(s). Alternativamente, los factores de transcripción pueden ser generales, implicados en el inicio de la transcripción de muchos genes diferentes.

[0028] En una forma de realización particularmente preferida, un método o uso de la invención se combina con otro tratamiento para el defecto genético. Como primer ejemplo, en los defectos genéticos que son el resultado de un producto génico ausente o disfuncional en una célula diferenciada, un método o uso de la invención preferiblemente se combina con un método para aumentar la expresión del producto génico ausente o disfuncional en la célula diferenciada. De este modo, la invención también proporciona un uso según la invención, que comprende además proporcionar a dicho individuo un medicamento para dotar a dicha célula diferenciada de al menos parte de la función normal de dicho gen mutado. Se describe un método para el mismo. Como segundo ejemplo, en defectos genéticos que son el resultado de un producto génico ausente o disfuncional en una célula diferenciada, un método o uso de la invención preferiblemente se combina con un método que usa el trasplante de células precursoras para dichas células diferenciadas en el paciente para generar células diferenciadas nuevas y funcionales. Las células precursoras pueden derivar de donantes sanos, pero en este caso el riesgo de rechazo es elevado [13]. Por lo tanto, se prefieren células precursoras derivadas del paciente. Dichas células precursoras se modifican genéticamente ex vivo para que expresen una copia funcional del gen afectado por la mutación. La invención proporciona un método para corregir otros defectos en las células precursoras secundarios a la mutación genética, y mejora la capacidad de diferenciación de dichas células precursoras in vivo.

[0029] En otra forma de realización, la invención proporciona un uso según la invención, donde dicho gen expresado de forma aberrante se identifica comparando un perfil de expresión de dicha célula precursora de un individuo que padece un defecto genético con una célula precursora correspondiente de un individuo sano. Se describe un método para el mismo. Se dice que un gen está expresado de forma aberrante cuando está

expresado diferencialmente al menos 2 veces en comparación con dicha célula precursora correspondiente de dicho individuo sano.

[0030] En un ejemplo de la invención, se realiza un estudio con transcurso temporal a gran escala de la expresión génica usando cultivos primarios de mioblastos humanos, donde se supervisa la miogénesis en las células con DMD y la primera reacción de la célula de diferenciación ante la ausencia de distrofina. Los resultados muestran una distribución en fases clara de las diferentes etapas de la miogénesis. Ya en la fase de mioblasto aparecen diferencias y, aunque la diferenciación parece iniciarse al mismo tiempo en cultivos sanos y con DMD, se observa que las células con DMD se diferencian con menos eficacia. Previamente se han realizado estudios que utilizaban la determinación del perfil de expresión génica para encontrar rutas implicadas en el mecanismo de la enfermedad [14-16]. Estos estudios, no obstante, no analizaron las diferencias moleculares al nivel de la célula precursora (mioblasto), sino que todos se centraron en la propia célula diferenciada (célula muscular).

[0031] Como ejemplo de referencia preferido, se han observado diferencias significativas en la expresión génica entre cultivos de células sanas y con DMD. Esta observación no habría sido prevista, ya que la distrofina en toda su longitud aún no está expresada en mioblastos y la expresión de Dp71 en mioblastos no debería ser impedida por las mutaciones, ya que se sitúan hacia el extremo 5' del sitio de iniciación de la traducción [17]. Uno de los genes expresados diferencialmente, el factor 2 de crecimiento de fibroblastos (FGF2), es expresado significativamente menos en los mioblastos con DMD. Los estudios in vitro e in vivo demostraron un papel importante del FGF2 en el reclutamiento de células satélite en la proliferación. La adición de FGF2 recombinante mejoró en dos veces el número de mioblastos en proliferación y no reprimió el inicio de la diferenciación [18-20]. Además, Doukas et al. demostraron que la administración transgénica dirigida de genes FGF2 y FGF6 llevó a una mejora de la reparación del músculo esquelético, mostrando la importancia de los genes FGF para la regeneración [21]. Estas observaciones indican que la expresión más baja de FGF2 en mioblastos DMD observada en un ejemplo de referencia puede explicar la proliferación reducida de mioblastos en cultivos DMD previamente observada [22-24].

[0032] Aunque la capacidad de proliferación probablemente se ve reducida y la diferenciación inhibida en los cultivos de células DMD, los resultados de un ejemplo de referencia indican que la sincronización de los distintos procesos es similar. Los genes implicados en la proliferación son regulados simultáneamente por disminución después de la inducción de la fusión en ambos cultivos de células sanas y con DMD (MCM6, CCNB2, CDC28, CKS2 y RPA3, Figura 5, grupo "crecimiento celular y mantenimiento"). Durante el proceso de fusión real de los mioblastos en miotubos, sin embargo, aparecen diferencias de expresión génica entre cultivos de células sanas y con DMD, lo que señala de nuevo a un potencial de fusión perjudicado de las células con DMD. En un ejemplo de referencia, se han descubierto genes expresados de forma aberrantes que están implicados en la fusión de mioblastos sanos pero que probablemente no participan en la fusión de mioblastos con DMD. De estos, se cree que la metaloendopeptidasa de membrana (MME) y Adican (DKFZp564I1922) están implicados en la adhesión celular y la señalización intercelular, que son importantes para la fusión celular [25]. En el estudio de la expresión génica, la laminina alfa 2 (LAMA2) se expresa menos continuamente en cultivos de células DMD, haciéndolas menos aptas para la adhesión. Esto explica la ausencia de la fuerza de adhesión dependiente de laminina alfa 2 que ha sido descrita previamente por Angoli et al. [26].

[0033] Sorprendentemente, el supresor tumoral mitocondrial 1 (MTUS1) y el receptor de endotelina de tipo A (EDNRA), de los que se cree que intervienen en la señalización, son regulados en aumento solo en las células con DMD al iniciarse la diferenciación. Estos genes posiblemente forman parte de rutas de señalización alternativas debido a la ausencia de distrofina.

[0034] En un estudio con transcurso de tiempo, la diferenciación y la fusión de mioblastos primarios humanos en miotubos dura aproximadamente 4 días. Después de esto, no es visible casi ningún cambio de expresión y los genes son expresados de forma estable [27]. Un fenómeno sorprendente es la regulación en aumento de la expresión génica sarcomérica después del inicio de la diferenciación en ambos cultivos de células sanas y con DMD y un significativo descenso posterior, a partir del día 6, detectable solo en miotubos de DMD. La ausencia de distrofina causa una inestabilidad sarcomérica, dando como resultado una respuesta secundaria que inicia la regulación por disminución del número de genes estructurales. Otras clases funcionales de proteínas que son reguladas en aumento o en disminución simultáneamente durante la diferenciación de los mioblastos no muestran diferencias en momentos posteriores, lo que indica que esta realimentación negativa es una característica única de las proteínas sarcoméricas en cultivos con DMD.

[0035] Dos terapias génicas actuales y prometedoras se basan en el restablecimiento de la distrofina en el complejo DGC o bien por la introducción mediada por AAV de un gen micro-DMD o bien por salto de un exón para restaurar el marco de lectura del gen [28-36]. Los resultados de un ejemplo de la invención indican que la eficacia de estas terapias puede no cumplir las presentes expectativas. Hasta aquí, los estudios se han centrado en la proteína distrofina y su localización, pero no se ha fijado específicamente la capacidad de regeneración del músculo después de la terapia. La presencia de distrofina solo corrige la inestabilidad sarcomérica y puede solo aliviar (temporalmente) pero no curar a los pacientes porque las rutas de señalización de regeneración no se

restauran. Desde este punto de vista, sería crucial iniciar la terapia temprano en la vida, antes de que estos cambios tengan lugar. Alternativamente, se debería buscar una intervención (farmacéutica) adicional para recuperar la capacidad de regeneración muscular normal. Un uso según la invención se podría aplicar en combinación con una terapia génica prometedora. En una forma de realización, la invención proporciona un uso según la invención, donde dicha distrofia muscular genética es distrofia muscular de Becker (DMB) o distrofia muscular de Duchenne (DMD). En una forma de realización preferida, la invención proporciona un uso según la invención, que comprende el salto de un exón de un gen de distrofina. Un ejemplo de la invención muestra diferencias moleculares entre mioblastos sanos y con DMD durante la miogénesis. Los niveles de FGF2 disminuidos y la expresión elevada de BMP4 en mioblastos con DMD reducen la capacidad de proliferación y les hacen menos competentes para la diferenciación. Además, se observa la expresión inferior de proteínas sarcoméricas en miotubos con DMD. Esta combinación de proliferación reducida, fusión dañada y mantenimiento dañado de los miotubos DMD lleva a una regeneración muscular ineficiente y contribuye al fenotipo grave de los pacientes DMD.

[0036] El trasplante de mioblastos expandidos ex vivo a pacientes de DMD es una terapia alternativa y prometedora [37]. Hay al menos dos opciones: el tratamiento con mioblastos procedentes de sujetos sanos o el trasplante celular autólogo. En el primer caso, el rechazo de las células por el anfitrión debido a la inducción de una respuesta inmune es un gran problema [13]. Se emplean donantes inmunocompatibles, preferiblemente miembros de la familia [37; 38], o inmunosupresores [39; 40] para controlar esta respuesta inmune. El trasplante celular autólogo tiene la ventaja de una oportunidad reducida de rechazo por el sistema inmunológico. Antes del trasplante autólogo, el defecto genético tiene que ser corregido por introducción de un transgén funcional [41] o un casete de expresión que produce secuencias antisentido de salto de exón [4]. En un ejemplo de la invención, un gen microDMD se introduce utilizando un AAV recombinante. En una forma de realización, la invención proporciona un uso según la invención de un oligonucleótido antisentido o ARNip contra BMP4 para reducir la expresión de BMP4 en mioblastos autólogos, y para mejorar el potencial regenerativo de dichos mioblastos autólogos en un paciente.

Ejemplos

Ejemplo 1

Material y métodos

Cultivo celular

[0037] Se aislaron mioblastos primarios humanos de biopsias de músculo esquelético [42] de tres individuos sanos (KM109, KM108 y HPP4) y tres pacientes de DMD (DL589.2 [deleción del exón 51-55], DL470.2 [deleción del exón 46-50] y 50685.1 [deleción del exón 48-50]) [42,43]. La edad en el momento de la biopsia variaba de 2-14 años. Los cultivos consistieron en mioblastos y otros tipos de células que estaban presentes en la biopsia original. La proporción de mioblastos se determinó para cada biopsia por tinción de desmina y recuento celular como se describe [44]. Los cultivos sanos y con DMD no difirieron en el porcentaje medio de mioblastos ($57 \pm 20\%$). Las células se cultivaron en medio de proliferación en matraces de cultivo recubiertas de colágeno. Cuando las células fueron un 80% confluentes, se inició la diferenciación reemplazando el medio de alta concentración de suero con medio con baja concentración de suero [27]. Todos los cultivos celulares usados para los experimentos tuvieron números de pase de entre 4 y 10.

Hibridación de ADNc

[0038] Se usaron chips de ADNc que contenían 4417 genes relacionados con los músculos y múltiples EST (con depósitos por triplicado) de una genoteca de ADNc humano verificada por secuencia 40K I.M.A.G.E. (Research Genetics) y se amplificaron por PCR, se imprimieron y se pre-hibridaron como se describe [27, 45]. El ARN total de los seis cultivos de células diferentes fue aislado los días 0, 1, 2, 4, 6, 10 y 14, amplificado, marcado y cohibridado con una referencia común como se describe [27, 45]. La calidad y cantidad del ARN y ARNc total fue controlada con el bioanalizador Bioanalyzer Lab-on-a-Chip RNA nano assay (Agilent Technologies).

Análisis de los datos

[0039] Todos los portaobjetos se escanearon con un escáner de Agilent (modelo 2565BA) y las intensidades de los depósitos se cuantificaron con el programa GenePix Pro 3.0 (Axon Instruments). Los ficheros de intensidad sin procesar se importaron en Rosetta Resolver® v4.0 (Rosetta Biosoftware) y se normalizaron con el modelo de error Axon/Genepix. Por condición (sano o DMD), se tuvieron en cuenta 9 mediciones por gen (3 réplicas biológicas, 3 réplicas técnicas) y se realizó un procedimiento de análisis de datos riguroso. Se analizaron los genes con una intensidad normalizada superior a la media + 2 desviaciones estándar (SD) de los controles chip negativos. Tenía que haber homogeneidad en una condición (sano o DMD) y en al menos un punto temporal. Se realizó un ANOVA ponderada de dos factores con el tiempo, el estado de la enfermedad y la interacción entre el tiempo y el estado de la enfermedad como variables. Los genes se consideraron expresados diferencialmente

cuando el valor P para el estado de la enfermedad fue $< 1 \times 10^{-5}$ (ajustado por Bonferroni). Los genes diferencialmente expresados en tiempo ($P < 1 \times 10^{-5}$) se dividieron funcionalmente en grupos usando Gene Ontology Tree Machine [46].

5 RT-PCR cuantitativa

[0040] El ADNC se obtuvo a partir del ARN total de los 6 cultivos de células por transcripción inversa utilizando hexámeros aleatorios y 0,5 mg de ARN total como modelo. Se diseñaron pares de cebadores PCR utilizando Primer3 (<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi/>). Los pares de cebadores oligonucleótidos usados para cada uno de los genes de este estudio corresponden a los nucleótidos siguientes: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, 510-529 y 625-644 (NM_002046) BMP4 394-413 y 484-503 (NM_001202) y AQP1 1129-1148 y 1227-1246 (NM_198098.1). Se realizaron PCR cuantitativas (Lightcycler, Roche) como se describe con una temperatura de hibridación de 58°C (para GAPDH y BMP4) o 62°C (para AQP1) [27]. Se determinaron las diluciones de ADNC óptimas y las concentraciones relativas usando una serie de dilución por gen. Cada gen se normalizó hasta la abundancia de ARNm de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (muestra expresión constante a lo largo del tiempo en los chips).

RT-MLPA

[0041] Se diseñaron sondas MLPA según el criterio descrito en [47]. La reacción se efectuó en 50 ng de ARN total según se describe en [48], excepto en que todos los oligonucleótidos usados como medias sondas se sintetizaron químicamente (Illumina Inc, San Diego), y se usaron dos fluoróforos durante la reacción PCR [49]. Dos ml de producto PCR marcado se mezclaron con 10 ml de formamida y 0,05 ml de ROX500 de tamaño estándar y se separaron en un secuenciador capilar ABI3700 (Applied Biosystems). Como hubo un rango considerable en las alturas máximas, se cargaron diluciones 1:10 donde fue necesario para obtener suficientes señales no saturadas. Los datos se exportaron a Excel para su posterior análisis.

[0042] Para cada sonda, la altura máxima relativa se usó como medida de intensidad. La normalización se realizó por división de la altura máxima relativa de cada sonda por la suma de la altura máxima de dos sondas de control amplificadas con el mismo fluoróforo. Las sondas de control se dirigieron a genes que no mostraron ningún cambio significativo en el nivel de expresión en el análisis del chip (subunidad B reguladora de proteína fosfatasa 3 y calnexina). El error típico se calculó sobre la base de 6 mediciones (3 cultivos medidos por duplicado).

35 Prueba de diferenciación y análisis inmunohistoquímico

[0043] Se añadió BMP4 humana recombinante (R&D Systems Inc.) a las células en concentraciones diferentes (entre 0,3 y 30 ng/ml) al iniciarse la diferenciación. Durante el cambio de medio, se añadió nueva BMP4 (cada 4 días). Las células se fijaron con metanol al 100% (-20°C) 7 o 11 días después de la privación de suero. Se realizó una tinción inmunohistoquímica como se describe previamente [44; 49]. El índice de diferenciación se calculó por división del número de células positivas para miosina por el número de células positivas para desmina (= células miogénicas capaces de diferenciarse) $\times 100\%$. Para el análisis, se ajustó un modelo de regresión lineal generalizado para explicar las diferencias en la diferenciación en función del día (7 o 11), de la concentración (0, 0,3, 1, 3, 10 y 30 ng/ml) y de la línea celular (sano y DMD). Las computaciones se realizaron usando R 2.0.1 [50]. El modelo incluyó un término que representa la interacción entre la línea celular y la concentración, que es el término usado para identificar niveles de concentración individuales para los que la línea celular mostró proporciones de diferenciación estadísticamente significativas. Las distribuciones de probabilidad se asociaron al error (modelo), y se calcularon tanto la distribución de error normal como la binomial.

50 Resultados

[0044] Para explorar la diferenciación potencial de mioblastos de DMD humanos, se realizó un análisis de la expresión génica a gran escala. Se analizaron cultivos de células de músculo esquelético primario humano de 6 individuos diferentes (3 sanos, 3 con DMD) con un chip de ADNC relacionado con los músculos. El ARN se aisló en la fase de mioblasto (día 0) y en distintos días de la diferenciación (día 1, 2, 4, 6, 10 y 14). Para encontrar genes expresados diferencialmente, se realizó un ANOVA ponderada de dos factores con el tiempo, el estado de la enfermedad y la interacción entre el tiempo y el estado de la enfermedad como variables. De los 4010 genes únicos presentes en el chip, 2423 dieron una señal significativa en al menos un punto del tiempo en bien todas las muestras sanas o bien todas las muestras con DMD. 94 genes fueron diferencialmente expresados entre cultivos sanos y DMD (52 en disminución, 42 en aumento en DMD, p (estado de la enfermedad) $< 1 \cdot 10^{-5}$). Sorprendentemente, ya en las células no diferenciadas ($t = 0$), 7 genes mostraron más de una diferencia del doble en el nivel de expresión de ARN (tabla 1 y tabla adicional 1a/b). Dos de estos (AQP1 y BMP4), son continuamente expresados en aumento en DMD a lo largo de todo el transcurso de tiempo. Esta diferencia se confirmó mediante RT-PCR cuantitativa (figura 1).

[0045] Dahlqvist et al. habían demostrado previamente en mioblastos de ratón inmortalizados (C2C12) que la BMP4 tiene un efecto inhibitorio sobre la diferenciación muscular [51]. Para determinar si esto sigue siendo cierto en cultivos de mioblastos humanos primarios y para averiguar si las células sanas y de DMD responden de manera diferente, se añadió BMP4 recombinante a las células. La adición de BMP4 recombinante al medio de fusión a $t = 0$ resultó en una reducción dependiente de la concentración de la fusión celular (menos células multinucleadas y positivas para miosina) en cultivos de células tanto sanas como con DMD (figuras 2, 3 y figura adicional 1). Las células DMD fueron significativamente más sensibles para BMP4 ($p < 0,05$) ya que una concentración 3 veces más baja causa un grado similar de inhibición de la diferenciación (tablas 2 y 3). Los resultados presentados corresponden al uso de la distribución normal como distribución de error (las distribuciones de error tanto normal como binominal proporcionaron conclusiones similares).

[0046] Junto con los genes que fueron diferencialmente expresados entre sanos y con DMD en el transcurso de todo el periodo, hubo un grupo pequeño de genes cuyos modelos de expresión empezaron a divergir después de la inducción de diferenciación (p (estado de la enfermedad) $< 1 \cdot 10^{-5}$). La Figura 4 muestra que estos genes se pueden dividir en dos grupos. En primer lugar, genes regulados en aumento durante la fusión en cultivos celulares sanos que permanecen bajos en cultivos DMD (BF, Adican y MME). En segundo lugar, dos genes con un nivel de expresión bajo constante en cultivos celulares sanos, pero regulados en aumento durante la fusión de las células DMD (MTUS1 y EDNRA). Estos resultados se confirmaron con RT-MLPA (figura adicional 2). La RT-MLPA es una técnica que permite la cuantificación rápida y simultánea de hasta 40 transcritos en una única reacción. Esta técnica se eligió porque permite evaluar múltiples muestras y transcritos en un ensayo más rápido y más barato que la RT-PCR cuantitativa.

[0047] La ANOVA de dos factores también revela genes cuya expresión cambia igualmente en el transcurso temporal de los cultivos tanto sanos como con DMD ($n = 68$, p (tiempo) $< 1 \cdot 10^{-5}$). El papel de estos genes en la miogénesis se ha comentado en una publicación anterior [27]. Usando Gene Ontology Tree Machine, estos genes se anotaron funcionalmente [46]. La Figura 5 muestra los patrones de expresión medios para células sanas y con DMD (grupos funcionales que contienen ≥ 6 genes). Las proteínas sarcoméricas ($n = 10$) mostraron una expresión significativamente disminuida en puntos temporales posteriores en células DMD en comparación con células sanas (prueba T pareada, $p < 0,01$). Otras categorías funcionales mostraron cambios similares del patrón de expresión en cultivos sanos y con DMD.

Ejemplo 2

[0048] Secuencias antisentido contra BMP4 y de salto del exón DMD en *mdx* x utrofina $-/-$ ratones; evaluación de la fuerza, la supervivencia, los niveles de proteína y de ARN del músculo.

[0049] Se crearon ratones pobres en distrofina y en utrofina (ratones *mdx.utrn* $-/-$) por cruce de ratones macho *mdx* $^{+/-}$.*utrn* $-/-$.*hDMD* $^{+/-}$ y hembra *mdx* $^{+/-}$.*utrn* $-/-$.*hDMD* $^{+/-}$ ('t Hoen et al, publicación en preparación). Los ratones se alojaron bajo condiciones estándar de laboratorio. Se alimentó a los animales con comida normal y se les dio acceso a agua potable *ad libitum*.

[0050] Ácidos ribonucleicos 2'-O-metil fosforotioato de 20 nucleótidos se sintetizaron por Eurogentec. Las secuencias antisentido se dirigieron contra

1. el límite exón 23 - intrón 23 del gen *Dmd* murino, secuencia AON-1: GGCCAAACCUCGGCUUACCU. La secuencia de este AON es idéntica al AON usado por Mann et al. y Lu et al. en sus experimentos en ratones *mdx* y produce un salto eficaz del exón mutado 23 del gen *Dmd*, dando como resultado la producción de proteína distrofina funcional [31, 52].
2. BMP4. Secuencias diseñadas AON-2 (AGACUGGAGCCGGUAA) y AON-3 (UGGCUCGGCUGGCGGG) en el exón 2 de la secuencia de ARNm NM_007554.

[0051] Antes de las inyecciones, los AON se diluyeron en NaCl al 0,9% (p/v) hasta una concentración final de 50 mg/ml. Los ratones se dividieron de forma aleatoria en tres grupos. El primer grupo fue inyectado por vía intravenosa, a partir de la edad de 21 días, durante 5 días consecutivos con 5 mg de AON-1. Los segundos y terceros grupos recibieron, además de AON-1, 5 x 5 mg de AON-2 o AON-3, respectivamente.

[0052] Antes de la primera inyección, y 1, 2 y 3 semanas después de la primera inyección, se tomó una muestra de sangre para determinar la actividad de creatina quinasa (un ensayo biológico conocido para el daño muscular). En estos mismos puntos temporales, se forzó a los animales a correr en un dispositivo Rotarod y se registró el periodo de tiempo antes de que los ratones se cayeran (un ensayo biológico para la fuerza muscular). Tres semanas después de la inyección, se administró azul de Evans intraperitonealmente (10 mg / kg de peso corporal) para teñir los músculos dañados. Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, y el gastrocnemio, cuádriceps, tibial anterior, corazón y el músculo del diafragma se aislaron y congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido antes de seguir con el procesamiento.

[0053] Los niveles de transcrito de ARNm de distrofina corregidos se midieron como se ha descrito antes [53]. Los niveles de proteína distrofina se determinaron por el método Western blot según se describe [53]. Se realizó una tinción estándar con hematoxilina/eosina en criosecciones de 10 μ m de los músculos para valorar la histología muscular. Se determinó el área media en corte transversal de la fibra. Se determinaron áreas positivas en azul de Evans en 10 secciones por músculo como medida del daño muscular. La inmunocoloración con el anticuerpo NCL-DYS2 y CD4 se realizó en las secciones para analizar la presencia de distrofina y la presencia de infiltrados inmunitarios [53].

Ejemplo 3

[0054] Corrección genética del defecto genético en los cultivos de mioblastos mdx y la coinyección de estos mioblastos a ratones mdx con nogina, inhibidora de la BMP4.

[0055] Se crearon ratones pobres en distrofina y en utrofina (ratones mdx.utrn^{-/-}) por cruce de ratones macho mdx^{+/-}.utrn^{-/-}.hDMD^{+/-} y hembra mdx^{+/-}.utrn^{-/-}.hDMD^{+/-} ('t Hoen et al, publicación en preparación). Los ratones se alojaron bajo condiciones estándar de laboratorio. Se alimentó a los animales con comida normal y se les dio acceso a agua potable ad libitum. Los mioblastos de ratón se obtuvieron del músculo de la pata trasera aislado de ratones macho mdx^{+/-}.utrn^{-/-} por tratamiento estándar con collagenasa / dispasa y cultivo en platos recubiertos de colágeno en un medio de proliferación estándar [22]. Los mioblastos proliferantes (1x10⁶ células / ratón) se transfectaron con 500 nM de AON-1: GGCCAAACCUCGGCUUACCU (2'-O-metil fosforotioato, Eurogentec), complejo con polietilenimina (Exgen500, Fermentas MBI, 3,5 μ l por μ g de AON). 2 días después de la transfección, las células fueron sedimentadas y absorbidas en 7 μ l de solución salina equilibrada de Hank, que contenía o no nogina, un inhibidor de la BMP4 ampliamente conocido (cantidades diferentes: 0, 10, 50 o 100 ng). Se inyectaron células en el músculo anterior tibial de ratones hembra mdx^{+/-}.utrn^{-/-} con una pipeta de vidrio con punta de 50 μ m. 3 o 10 días después de la inyección, los ratones fueron sacrificados, y se hicieron criosecciones en serie. Las secciones se tiñeron con hematoxilina/eosina y con distrofina y anticuerpos específicos del cromosoma Y para analizar la supervivencia celular, la migración y la expresión de distrofina.

Breve descripción de los dibujos

[0056]

Figura 1. Expresión génica de *AQP1* (A) y *BMP4* (B) determinada con microchips de oligonucleótidos (panel superior) o RT-PCR cuantitativa (panel inferior) (Lightcycler, Roche). En el eje x se visualiza el tiempo en días. En el eje y se visualiza el log2 del ratio de expresión de (normalizado a sano a t = 0) o - Δ (Ct) (normalizado a sano a t = 0). El valor Ct es proporcional al ²log de la cantidad inicial de ARNm y, por lo tanto, es comparable al 2log del ratio de expresión. Las barras verticales representan desviaciones estándar de los diferentes cultivos (n = 3).

Figura 2. Coloración inmunohistoquímica de miotubos sanos y con DMD incubados con concentraciones diferentes de BMP4, evaluados el día 7 de la diferenciación. Las células se tiñeron con DAPI (azul) y anticuerpos para desmina (rojo) y miosina (verde).

Figura 3. Índice de diferenciación mioblastos sanos y con DMD después de la adición de diferentes concentraciones de BMP4 recombinante. Las células se fijaron el día 7. Modelo de regresión, ** p < 0,01, * p < 0,05.

Figura 4. log2 de los ratios de expresión génica de genes diferencialmente expresados entre mioblastos sanos y con DMD después de la inducción de la diferenciación; *BF*, *MME*, *Adlcan*, *MTUS1*, *EDNRA*. Las barras verticales muestran desviaciones estándar de las diferentes líneas usadas (n = 3).

Figura 5. Media de log2 de la expresión génica de genes en diferentes categorías funcionales durante la fusión de mioblastos sanos y con DMD. Los genes sarcoméricos muestran en la miogénesis de DMD tardía (días 6, 10 y 14) una reducción en la expresión génica. * prueba T pareada, p < 0,01. Los genes implicados en otras categorías funcionales (crecimiento celular y mantenimiento, unión a proteínas, aumento y disminución del metabolismo) no muestran una diferencia significativa entre sano y DMD en ningún punto temporal (n $\geq$ 6).

[0057] Figura adicional 1. Índice de diferenciación de mioblastos sanos y con DMD después de la adición de diferentes concentraciones de BMP4 recombinante. Las células se fijaron el día 11. Modelo de regresión, * p < 0,05.

[0058] Figura adicional 2. Niveles de expresión génica de genes diferencialmente expresados en tiempo entre la fusión de mioblastos sanos y con DMD evaluados con *RT-MLPA*; *BF*, *MME*, *Adlcan*, *MTUS1*. Las barras verticales muestran el error típico para las diferentes líneas usadas (n = 3).

Tabla 2: Modelo de regresión lineal generalizado para el índice de diferenciación

Coeficientes	valor P
Intercepto	$4,02 \cdot 10^{-7}$ ***
Línea celular (DMD)	0,22844
Concentración BMP4 0,3 ng / ml	0,47855
Concentración BMP4 1 ng / ml	0,30271
Concentración BMP4 3 ng / ml	0,86939
Concentración BMP4 10 ng / ml	0,48777
Concentración BMP4 30 ng / ml	0,00867 **
Días en diferenciación (11 días)	0,09281
Int. línea celular - con. BMP4 0,3 ng / ml	0,25261
Int. línea celular - con. BMP4 1 ng / ml	0,08274
Int. línea celular - con. BMP4 3 ng / ml	0,43757
Int. línea celular - con. BMP4 10 ng / ml	0,04648 *
Int. línea celular - con. BMP4 30 ng / ml	0,00756 **

Intercepto: proporción de referencia para el cultivo de células sanas, con 0,3 ng / ml de BMP4 el día 7.
 *** P <0,001, ** P <0,01, * P <0,05

Tabla 3: Modelo de regresión lineal generalizado para el índice de diferenciación, tabla ANOVA

Variables	valor P
Línea celular	0,04069 *
Concentración de BMP4	4,74e-05 ***
Días en diferenciación	0,09281
Int. línea celular - concentración	0,08305

*** P <0,001, ** P <0,01, * P <0,05

5

Tabla adicional 2: Modelo de regresión lineal generalizado para el índice de diferenciación

Coeficientes	valor P
Intercepto	$4,02 \cdot 10^{-7}$ ***
Línea celular (DMD)	0,22844
Concentración BMP4 0,3 ng / ml	0,47855
Concentración BMP4 1 ng / ml	0,30271
Concentración BMP4 3 ng / ml	0,86939
Concentración BMP4 10 ng / ml	0,48777
Concentración BMP4 30 ng / ml	0,00867 **
Días en diferenciación (11 días)	0,09281
Int. línea celular - con. BMP4 0,3 ng / ml	0,25261
Int. línea celular - con. BMP4 1 ng / ml	0,08274
Int. línea celular - con. BMP4 3 ng / ml	0,43757
Int. línea celular - con. BMP4 10 ng / ml	0,04648 *
Int. línea celular - con. BMP4 30 ng / ml	0,00756 **

Intercepción: proporción inicial para el cultivo de células sanas, con 0,3 ng / ml de BMP4 el día 7.

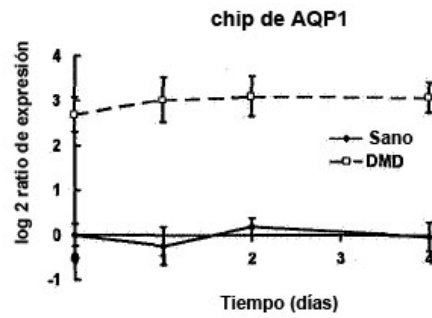
Coeficientes	valor P
*** P <0,001, ** P <0,01, * P <0.05	
Tabla adicional 3: Modelo de regresión lineal generalizado para el índice de diferenciación, tabla ANOVA	
Variables	P-valor
Línea celular	0,04069 *
Concentración BMP4	4,74e-05 ***
Días en diferenciación	0,09281
Int. línea celular - concentración	0,08305
*** P <0,001, ** P <0,01, * P <0,05	

REIVINDICACIONES

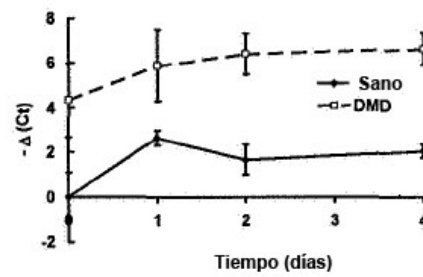
1. Uso de un compuesto para reducir, inhibir y/o antagonizar la expresión de proteína morfogenética ósea 4 (BMP4) en una célula, para la producción de un medicamento para el alivio de un síntoma de una distrofia muscular genética en un individuo, donde dicha distrofia muscular genética es la distrofia muscular de Duchenne (DMD) o la distrofia muscular de Becker (DMB), y donde dicho compuesto comprende un ARN antisentido de BMP-4 .
5
2. Uso según la reivindicación 1, donde dicha célula es una célula mioblasto o un precursor de la misma.
3. Uso según la reivindicación 1 o 2, donde la expresión se reduce, se inhibe y/o se antagoniza mediante un oligonucleótido antisentido de BMP4 transducido por virus.
4. Uso según la reivindicación 1 o 2, donde dicho compuesto se proporciona a dicha célula mediante un vector viral.
10
5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 y 3-4, que comprende además el uso de un segundo compuesto para la preparación de un medicamento para el tratamiento de dicho individuo donde dicho segundo compuesto proporciona a una célula muscular de dicho individuo al menos parte de la función normal de un gen que se asocia a dicha distrofia muscular genética (gen mutado).
15
6. Uso según la reivindicación 5, donde dicho segundo compuesto comprende un oligonucleótido, para saltar un exón de un gen de distrofina.
7. Un oligonucleótido antisentido complementario de un exón de BMP-4 para usar en el tratamiento de una distrofia muscular genética, donde dicha distrofia muscular genética es la distrofia muscular de Becker (DMB) o la distrofia muscular de Duchenne (DMD).
20
8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde dicho oligonucleótido antisentido es complementario a un exón de BMP-4.
9. Uso según la reivindicación 8, donde dicho oligonucleótido antisentido se proporciona a dicha célula mediante un vector viral, y preferiblemente dicho vector viral comprende un casete de expresión para la expresión de dicho oligonucleótido antisentido.
25

Figura 1

A

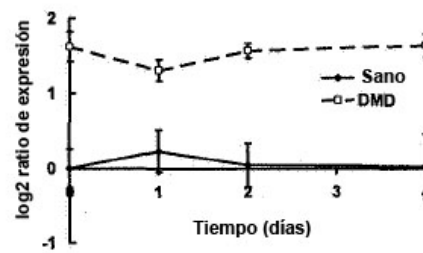


PCR cuantitativa de AQP1



B

chip de BMP4



PCR cuantitativa de BMP4

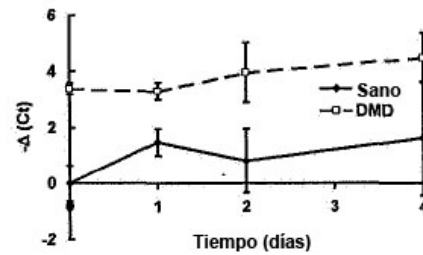


Figura 2

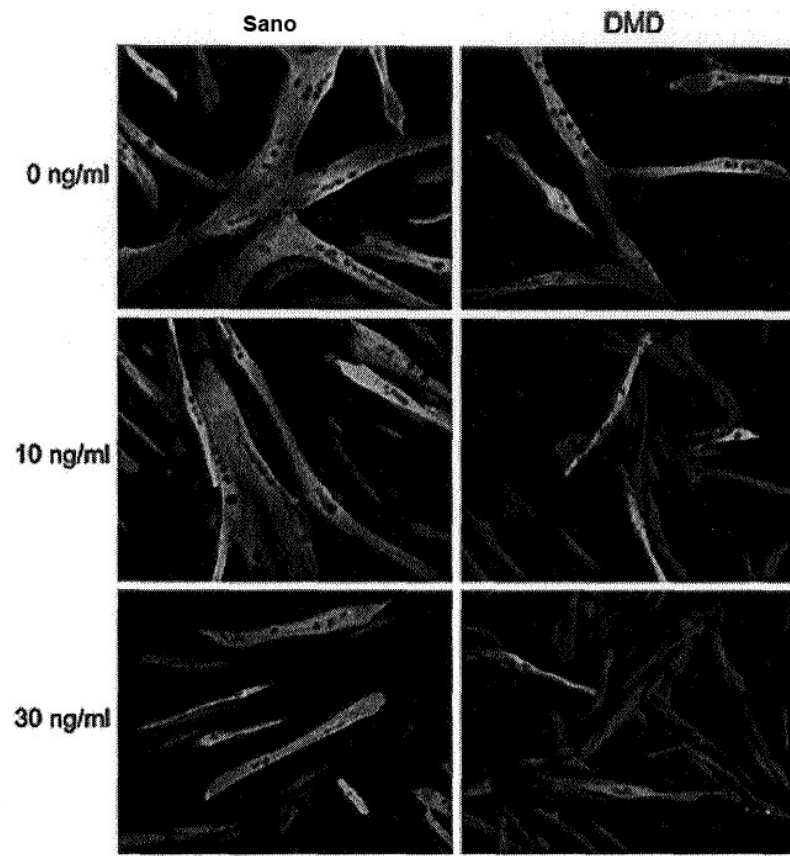


Figura 3

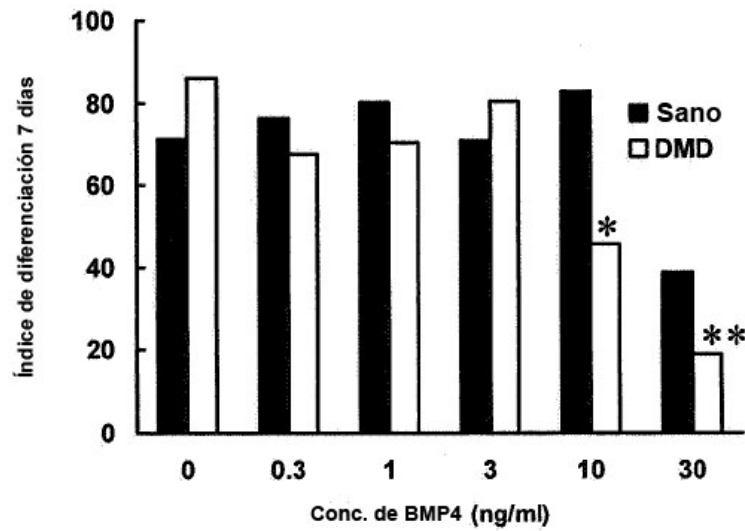


Figura adicional 1

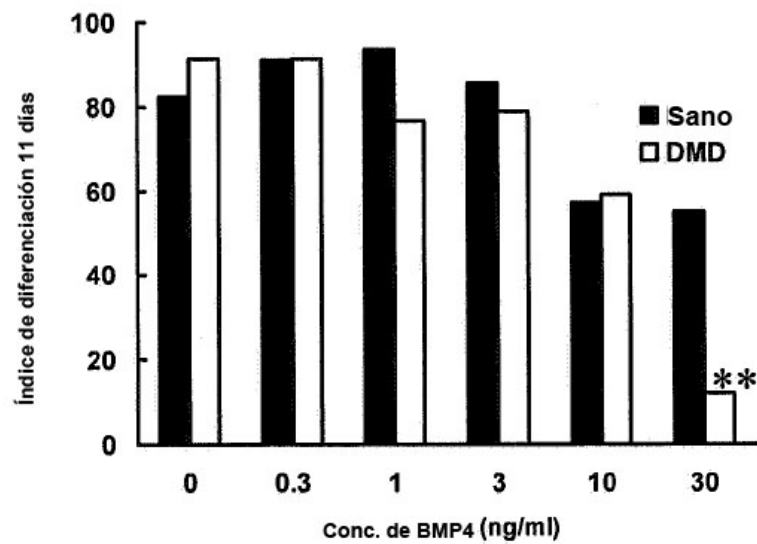


Figura 4

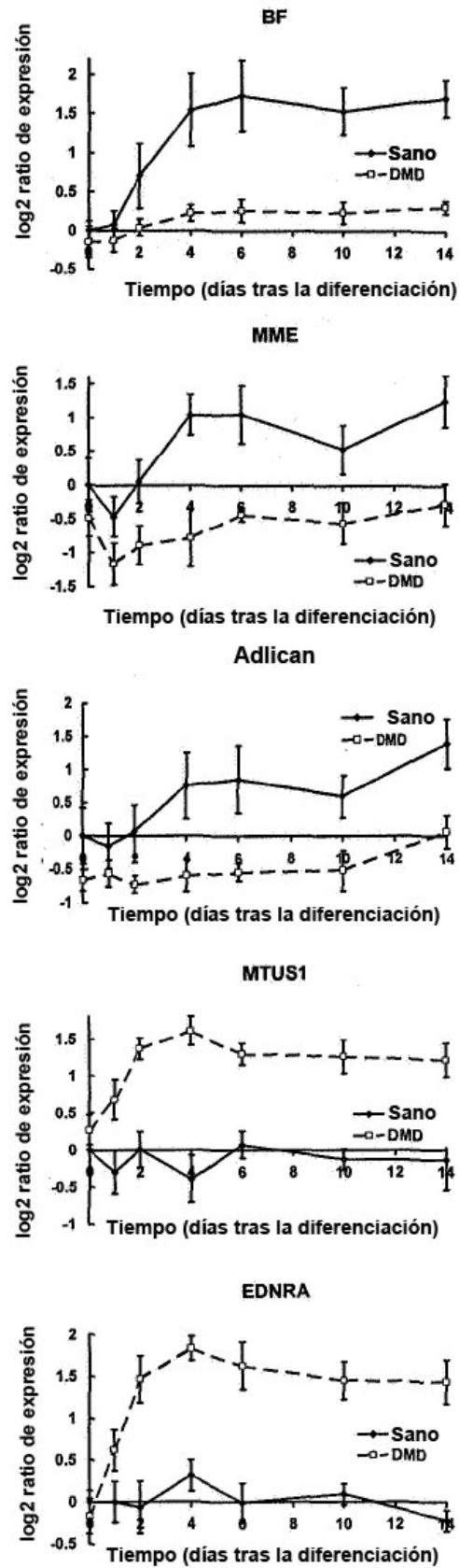


Figura 5

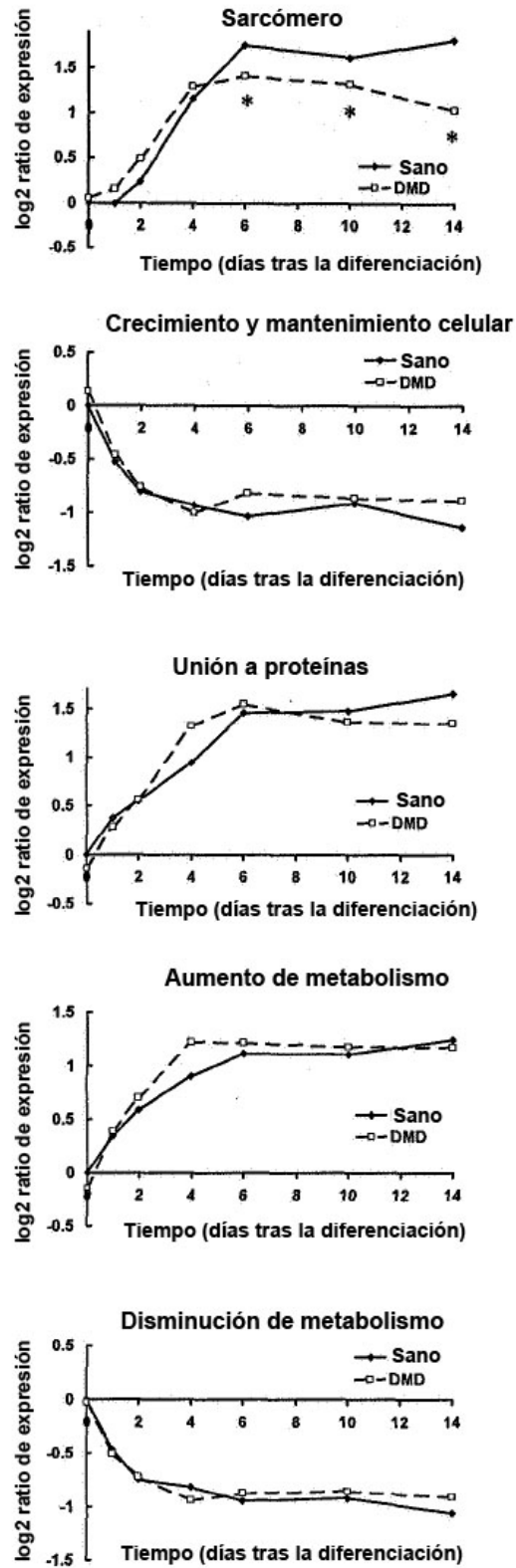


Figura 6

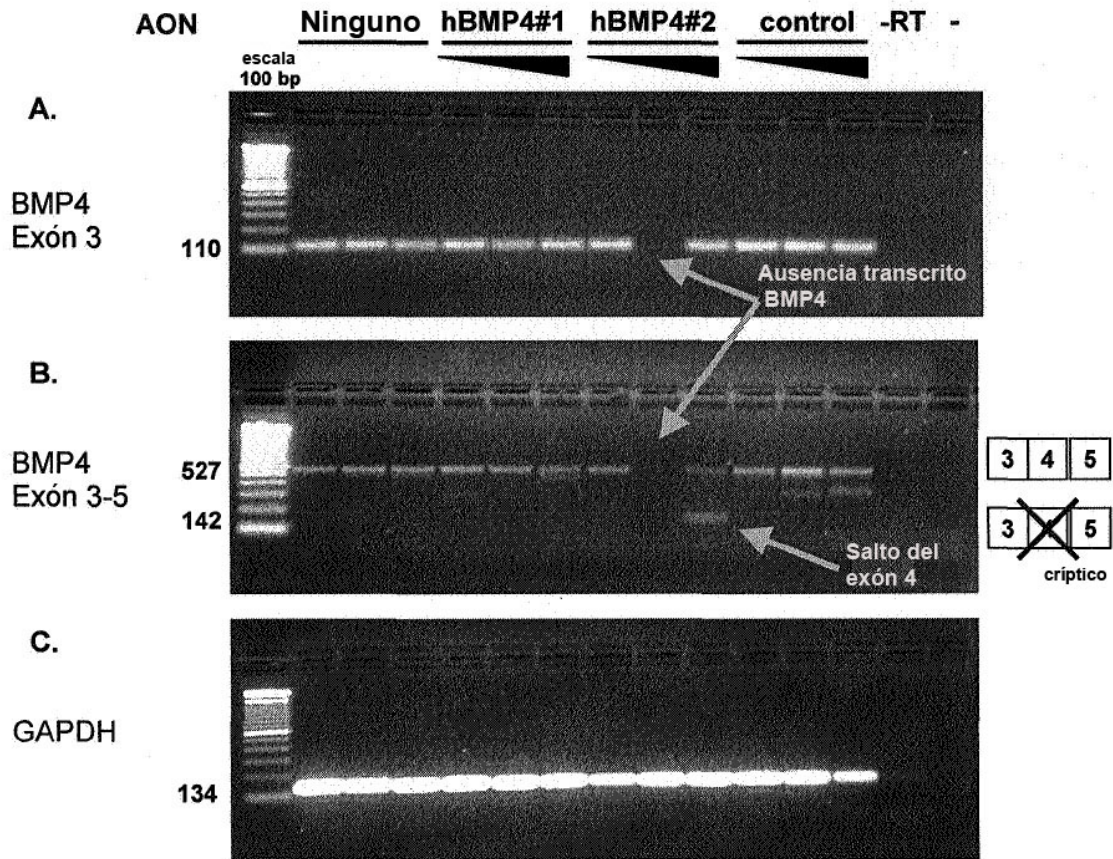


Figura adicional 1

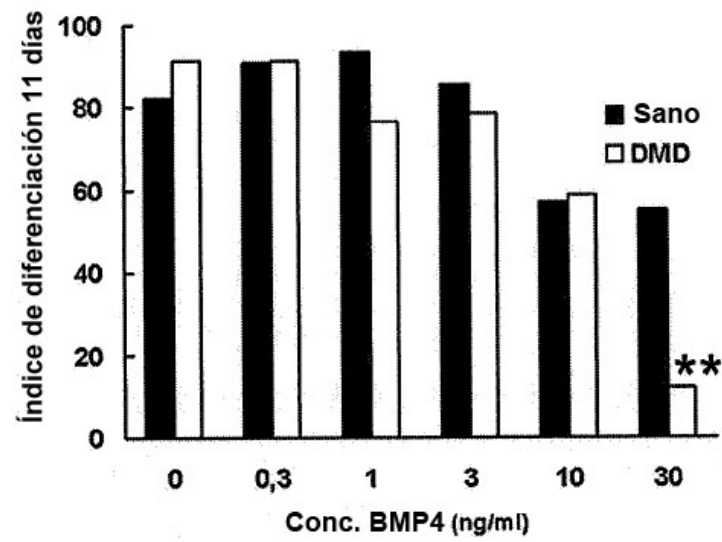


Figura adicional 2

